

# 新型基于 1,8-萘酰亚胺的汞离子荧光探针的合成与性质研究

宋 涛<sup>a</sup>, 杨成玉<sup>a</sup>, 蒋菊华<sup>a</sup>, 周宝成<sup>a</sup>, 韩益丰<sup>a,b</sup>

(浙江理工大学 a. 理学院, b. 先进纺织材料与制备技术教育部重点实验室, 杭州 310018)

**摘 要:** 设计合成了一种用于检测  $\text{Hg}^{2+}$  的 1,8-萘酰亚胺类荧光探针(NMI),采用现代波谱技术对探针的结构进行了表征,并考察了其光谱性能。研究表明,NMI 对  $\text{Hg}^{2+}$  有优秀的选择性和灵敏度,它们之间的结合比为 1:1,常见共存金属离子对其测定无干扰。此外,NMI 还能够可视化检测  $\text{Hg}^{2+}$ ,这对检测水质和生物体内的  $\text{Hg}^{2+}$  具有潜在的应用价值。

**关键词:** 荧光探针;  $\text{Hg}^{2+}$  离子; 1,8-萘酰亚胺; 可视化检测

**中图分类号:** O656 **文献标志码:** A

## 0 引 言

$\text{Hg}^{2+}$  离子,广泛存在于自然界,是目前最引人关注的重金属污染物之一。 $\text{Hg}^{2+}$  离子易与生物体内疏基化合物紧密结合,改变相关蛋白质的表达性质,使其在生物体内的正常代谢紊乱,从而严重影响有机体的功能<sup>[1]</sup>。 $\text{Hg}^{2+}$  离子尤其是甲基汞等易被生物体吸收,可通过食物链传递,难以通过代谢排出体外,最终在生物体内高度地富集,严重危害人类的安全。因此,研制成本低、响应快、易实现、能应用于自然环境和生物体系的新型  $\text{Hg}^{2+}$  检测手段成为人们日益关注的研究课题<sup>[2-4]</sup>。传统的用于检测  $\text{Hg}^{2+}$  离子的方法主要有分光光度法、原子吸收和发射光谱法、质谱法和伏安法等,它们均需复杂的操作或是昂贵的仪器,不适用于实时、原位的分析检测。与之相比,近年来发展的荧光分析法因其高效灵敏、快速便捷而且能实时、定位检测等优点而受到生物化学和化学生物学研究者的广泛关注<sup>[5-7]</sup>。1,8-萘酰亚胺类化合物是一类重要的荧光染料,由于具有良好的光化学和热稳定性及结构易修饰等突出的光物理

和化学性能,而被研究用作荧光标记物和特定金属离子的光化学传感器<sup>[8-10]</sup>。本论文利用 1,8-萘酰亚胺为荧光母团,取代的 8-羟基喹啉为识别基团而设计合成了可用于水相中  $\text{Hg}^{2+}$  离子检测的荧光小分子探针。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料与仪器

试剂:4-溴-1,8-萘二甲酸酐(玛雅化学试剂有限公司)、正丁胺、哌嗪、氯乙酰氯、8-羟基喹啉、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、乙二醇单甲醚、碘化钠等均均为市售化学纯(国药集团化学试剂有限公司),甲醇、石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷等溶剂均为工业溶剂重蒸后使用。仪器:AVANCE-AV 400 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司),LS45 型荧光分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司),DF-101D 集热式磁力加热搅拌器(河南省予华仪器有限公司)。

### 1.2 探针分子 NMI 的合成

相应关键中间体和目标分子的合成路线见图 1。

收稿日期: 2014-05-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(20902082);浙江省自然科学基金项目(Y201225426)

作者简介: 宋 涛(1987-),男,山东潍坊人,硕士研究生,主要从事有机化学方面的研究。

通信作者: 韩益丰, E-mail: hanyf@zstu.edu.cn

### 1.2.1 化合物3的合成

在500 mL的三口烧瓶中加入5.0 g 4-溴-1,8-萘二甲酸酐和200 mL乙醇,在氮气保护的条件下加热回流溶解,待原料溶解后,向反应液中注入2.5 mL正丁胺,升温至80℃,搅拌回流反应8 h, TLC检测反应完毕,冷却析晶,抽滤,冷乙醇洗涤3次,得到黄色针状固体5.1 g,产率85%,产物无需纯化可直接用于下一步反应。

### 1.2.2 化合物2的合成

在25 mL的两口烧瓶中依次加入1.1 g化合物3和1.4 g哌嗪,氮气保护,注入10 mL乙二醇单甲醚回流溶解,升温至120℃,搅拌回流反应8 h, TLC监测反应完毕。将反应液倒入100 mL水中,冷却析晶,抽滤后用乙醇重结晶得到黄色固体产物0.9 g,产率86%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ8.51(d, *J*=7.2 Hz, 1H), 8.45(d, *J*=8.1 Hz, 1H), 8.35(d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.62(t, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.14(d, *J*=8.0 Hz, 1H), 4.17~4.01(m, 2H), 3.26~2.99(m, 8H), 1.64(t, *J*=7.5 Hz, 2H), 1.37(m, 2H), 0.90(t, *J*=7.3 Hz, 3H)。

### 1.2.3 化合物1的合成

在50 mL的两口烧瓶中加入0.9 g化合物2, 0.7 g 4-二甲氨基吡啶(DMAP), 20 mL无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 氮气保护, 冰水浴下滴加0.7 mL氯乙酰氯, 搅拌1 min, 加热回流反应6 h。TLC检测反应完毕, 加入20 mL水淬灭反应, 然后用10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>萃取3次, 用无水硫酸钠干燥, 旋干二氯甲烷, 得到粗产物。再经快速硅胶柱分离得到0.6 g化合物1, 产率56%。M.p.=159~161℃; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ8.52(d, *J*=7.1 Hz, 1H), 8.45(d, *J*=7.9 Hz, 1H), 8.34(d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.66(t, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.15(d, *J*=8.0 Hz, 1H), 4.09(t, *J*=7.3 Hz, 2H), 3.87(s, 2H), 3.73(s, 2H), 3.17(d, *J*=17.5 Hz, 4H), 2.13(s, 2H), 1.71~1.56(m, 2H), 1.37(dd, *J*=14.7, 7.4 Hz, 2H), 0.90(t, *J*=7.2 Hz, 3H)。 <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ164.35, 163.24, 162.79, 153.74, 131.24, 130.19, 128.62, 125.19, 122.43, 116.86, 114.50, 51.79, 45.50, 41.27, 39.81, 39.11, 29.2, 19.36, 12.84。

### 1.2.4 探针分子NM1的合成

在25 mL的三口烧瓶中加入176 mg 8-羟基喹啉, 用5 mL乙腈溶解, 得到无色澄清溶液, 再加入1 mL(5 M)氢氧化钠溶液, 搅拌后得到黄色浑浊溶液, 再加入0.5 g化合物1以及0.2 g碘化钠, 80℃回流反应5 h, TLC检测, 反应完毕, 冷却有固体析出, 减

压过滤, 用乙腈洗涤2次, 得到粗产物。再经快速硅胶柱分离得到260 mg探针NM1, 产率41%。M.p.=156~157℃; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ8.46(dd, *J*=21.6, 7.6 Hz, 3H), 8.31(d, *J*=8.3 Hz, 1H), 8.13(s, 1H), 7.60(dd, *J*=13.5, 6.8 Hz, 2H), 7.24~7.05(m, 3H), 4.55(d, *J*=4.9 Hz, 2H), 4.08(t, *J*=7.3 Hz, 2H), 3.26(s, 4H), 2.83(s, 4H), 1.68~1.53(m, 2H), 1.36(dd, *J*=14.6, 7.3 Hz, 2H), 0.89(t, *J*=7.2 Hz, 3H)。 <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ169.94, 164.33, 163.90, 156.58, 155.52, 149.12, 136.73, 132.32, 131.01, 129.99, 129.73, 126.07, 125.70, 123.23, 122.35, 122.01, 116.96, 114.92, 61.51, 53.50, 53.00, 43.96, 40.00, 30.16, 20.31, 13.78。

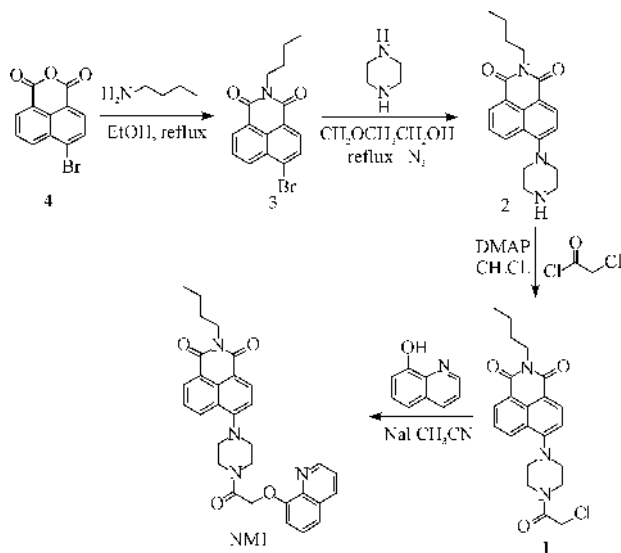


图1 目标探针分子NM1的合成路线

## 2 结果与讨论

### 2.1 探针分子NM1对Hg<sup>2+</sup>响应的紫外光谱测定

由图2可以看出, 逐渐向10 μM的探针溶液(0.01 M HEPES buffer, pH=7.17)中加入Hg<sup>2+</sup>离子, 探针在405 nm处的吸收峰逐渐下降, 并在470、

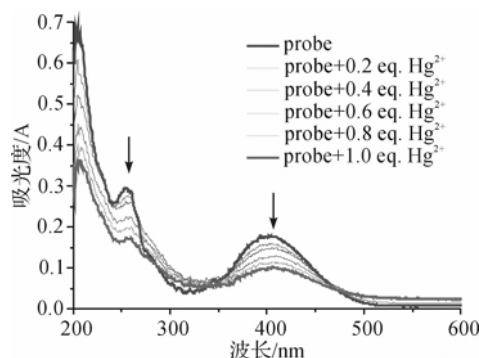


图2 NM1与Hg<sup>2+</sup>作用前后的紫外光谱变化

340、285 nm 处呈现三个等吸点,表明 **NM1** 与  $\text{Hg}^{2+}$  之间形成了新的络合物。

## 2.2 探针分子 **NM1** 对 $\text{Hg}^{2+}$ 的识别

### 2.2.1 探针分子 **NM1** 对 $\text{Hg}^{2+}$ 的选择性与竞争性测试

在  $10\ \mu\text{M}$  的探针溶液( $0.01\ \text{M}$  HEPES buffer,  $\text{pH}=7.17$ )中,分别加入相同浓度( $5\ \mu\text{M}$ )的各种常见的金属离子溶液( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ )。选择性实验结果显示,除  $\text{Hg}^{2+}$  离子以外,其余各种常见金属离子对探针分子 **NM1** 的荧光几乎无影响,表明探针分子 **NM1** 对  $\text{Hg}^{2+}$  离子的优秀选择性(图 3)。而进一步的竞争性实验显示,上述常见共存金属离子对  $\text{Hg}^{2+}$  离子的测定无干扰。在  $10\ \mu\text{M}$  的探针溶液( $0.01\ \text{M}$  HEPES buffer,  $\text{pH}=7.17$ )中,加入  $5\ \mu\text{M}$  的  $\text{Hg}^{2+}$  离子,再加入等当量的常见共存金属离子后,探针分子 **NM1** 的荧光并没有发生明显的改变(图 4),表明探针分子 **NM1** 与  $\text{Hg}^{2+}$  离子之间是特

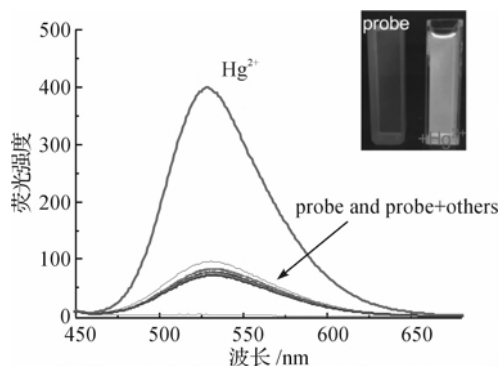


图 3 **NM1** ( $10\ \mu\text{M}$ )对不同的金属离子( $5\ \mu\text{M}$ )的荧光响应

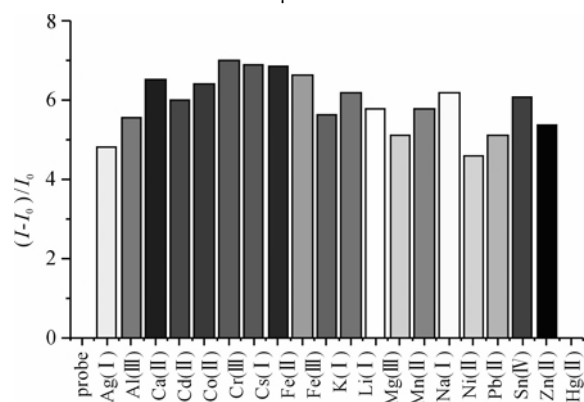


图 4 在各种金属离子( $5\ \mu\text{M}$ )的存在下  $\text{Hg}^{2+}$  对 **NM1** ( $10\ \mu\text{M}$ )荧光的影响

注:  $I_0$  为空白探针的荧光强度,  $I$  为加入相应离子时探针的荧光强度。

异性结合的。而当观察探针分子 **NM1** 在加入  $\text{Hg}^{2+}$  离子前后的荧光变化时可以发现,加入  $\text{Hg}^{2+}$  离子后溶液的荧光由极其微弱的黄绿色变成亮绿色,表明探针分子 **NM1** 可用于对  $\text{Hg}^{2+}$  的可视化检测(图 3)。

### 2.2.2 探针分子 **NM1** 对 $\text{Hg}^{2+}$ 离子的荧光浓度滴定实验

在  $10\ \mu\text{M}$  的探针溶液( $0.01\ \text{M}$  HEPES buffer,  $\text{pH}=7.17$ )中,逐渐加入  $\text{Hg}^{2+}$  离子,随着  $\text{Hg}^{2+}$  离子浓度逐渐的增加,探针分子 **NM1** 的荧光强度也逐渐增强,当  $\text{Hg}^{2+}$  离子浓度为  $10\ \mu\text{M}$  时( $1\text{eq}$ )趋于一个固定值(图 5)。荧光滴定实验结果显示,在低浓度下( $0\sim 10\ \mu\text{M}$ )探针分子 **NM1** 的荧光强度与  $\text{Hg}^{2+}$  的浓度呈良好的线性关系( $Y=19.07+796.52X$ ,  $R=0.987$ )(图 6)。由此,根据检测线的计算方法可测得探针分子 **NM1** 对  $\text{Hg}^{2+}$  离子的检测限为  $9.04\ \text{nM}^{[10]}$ ,该检测限远低于美国 FDA 规定的饮用水中  $\text{Hg}^{2+}$  离子含量的标准值。因此,探针分子 **NM1** 可用于饮用水中痕量  $\text{Hg}^{2+}$  的含量检测。

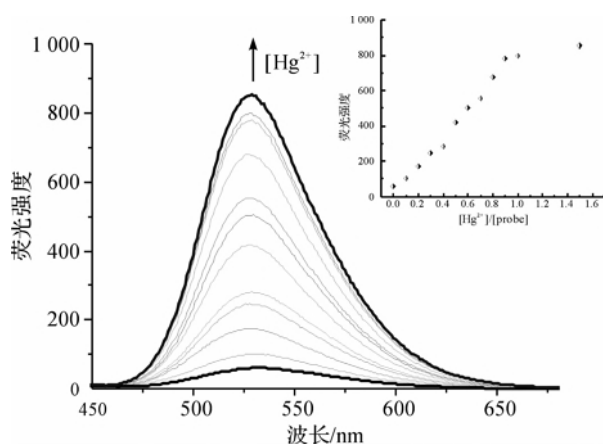


图 5 **NM1** ( $10\ \mu\text{M}$ )随着  $\text{Hg}^{2+}$  浓度增加( $0\sim 10\ \mu\text{M}$ )荧光强度的变化

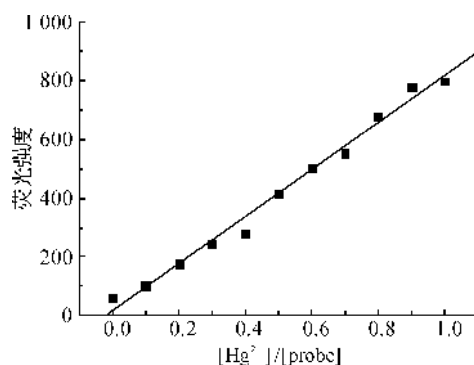


图 6  $\text{Hg}^{2+}$  离子浓度( $0\sim 10\ \mu\text{M}$ )与 **NM1** 荧光强度之间的关系

### 2.2.3 探针分子 NM1 对 $\text{Hg}^{2+}$ 离子的结合模式

为了进一步研究探针分子 NM1 与  $\text{Hg}^{2+}$  离子之间的识别机理和结合模式,本文利用 Job's Plot 法进行测定。从图 7 可以清楚地看出, $\text{Hg}^{2+}$  离子浓度为总浓度的 0.5 时荧光值的改变最为明显,这表明探针分子 NM1 与  $\text{Hg}^{2+}$  离子之间以 1 : 1 的方式进行结合。

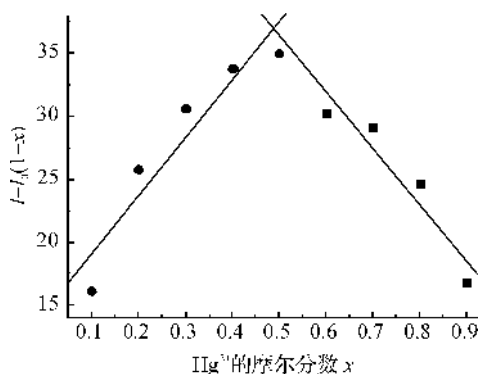


图 7 在 10 mM HEPES 缓冲溶液中( $\text{pH}=7.17$ )

NM1 与  $\text{Hg}^{2+}$  的 Job's plot 图

注:NM1 与  $\text{Hg}^{2+}$  的浓度和为 10  $\mu\text{M}$ ,  $x$  为汞离子的摩尔分数,  $I_0$  为空白探针的荧光强度,  $I$  为不同汞离子摩尔分数下探针的荧光强度。

## 3 结 论

a) 本论文设计合成了一种基于 1,8-萘酰亚胺的 OFF-ON 型荧光小分子探针 NM1,并通过光谱学手段确定了探针分子的结构。

b) 探针分子 NM1 对  $\text{Hg}^{2+}$  离子具有优秀的选择性和响应灵敏度,而常见共存金属离子对其测定无干扰。

c) 由荧光滴定实验和 job's plot 实验确定了探针分子 NM1 与  $\text{Hg}^{2+}$  离子之间的结合比为 1 : 1。

d) 探针分子 NM1 对  $\text{Hg}^{2+}$  离子的检测限可达 9.04 nM,该值远低于美国 FDA 规定的饮用水中  $\text{Hg}^{2+}$  离子含量的标准值,表明 NM1 可用于饮用水中痕量  $\text{Hg}^{2+}$  的含量检测。

## 参考文献:

- [1] Tchounwou P B, Ayensu W K, Ninashvili N, et al. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health[J]. Environmental Toxicology, 2003, 18(3): 149-175.
- [2] Areti S, Yarramala D S, Samanta K, et al. Glyco-conjugate as selective switch-on molecule for  $\text{Hg}^{2+}$  in the presence of albumin proteins, blood serum milieu and on silica gel solid support[J]. RSC Advances, 2014, 4(35): 16290-16297.
- [3] Zhang J, Yu S H. Highly photoluminescent silicon nanocrystals for rapid, label-free and recyclable detection of mercuric ions[J]. Nanoscale, 2014, 6(8): 4096-4101.
- [4] Huang J, Xu Y, Qian X. Rhodamine-based fluorescent off-on sensor for  $\text{Fe}^{3+}$  in aqueous solution and in living cells: 8-aminoquinoline receptor and 2: 1 binding[J]. Dalton Transaction, 2014, 43(16): 5983-5989.
- [5] Tian M, Liu L, Li Y, et al. An unusual OFF-ON fluorescence sensor for detecting mercury ions in aqueous media and living cells[J]. Chemical Communication, 2014, 50: 2055-2057.
- [6] Guo Z, Park S, Yoon J, et al. Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications[J]. Chemical Society Review, 2014, 43: 16-29.
- [7] Mauro M, Aliprandi A, Septiadi D, et al. When self-assembly meets biology: luminescent platinum complexes for imaging applications[J]. Chemical Society Review, 2014, 43: 4144-4166.
- [8] Cui L, Peng Z, Ji C, et al. Hydrazine detection in the gas state and aqueous solution based on the Gabriel mechanism and its imaging in living cells[J]. Chemical Communication, 2014, 50: 1485-1487.
- [9] Guo T, Cui L, Shen J, et al. A dual-emission and large Stokes shift fluorescence probe for real-time discrimination of ROS/RNS and imaging in live cells[J]. Chemical Communication, 2013, 49: 1862-1864.
- [10] Xu L, Xu Y, Zhu W, et al. A highly selective and sensitive fluorescence "turn-on" probe for  $\text{Ag}^{+}$  in aqueous solution and live cells[J]. Dalton Transaction, 2012, 41: 7212-7217.

## Research on Synthesis and Propitiates of New $\text{Hg}^{2+}$ Ion Fluorescent Probe Based on 1,8-Naphthalimide

SONG Tao<sup>a</sup>, YANG Cheng-yu<sup>a</sup>, JIANG Ju-hua<sup>a</sup>, ZHOU Bao-cheng<sup>a</sup>, HAN Yi-feng<sup>a,b</sup>

(a. School of Science; b. Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Manufacturing Technology, Ministry of Education, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** A 1,8-naphthalimide-based fluorescent probe (**NM1**) for  $\text{Hg}^{2+}$  ion detection was designed and synthesized. It was characterized by modern spectroscopy methods. Besides, its spectral property was investigated. The results show that **NM1** exhibits excellent sensitivity and selectivity to  $\text{Hg}^{2+}$ . The combination proportion is 1 : 1. Common coexistent metal ions have no interference in detection. Furthermore, **NM1** can achieve visual detection of  $\text{Hg}^{2+}$ . Those results showed that **NM1** has potential application value for the detection of  $\text{Hg}^{2+}$  in water and in living systems.

**Key words:** fluorescent probe;  $\text{Hg}^{2+}$  ion; 1,8-naphthalimide; visual detection

(责任编辑: 许惠儿)